

モデル生物のゲノムサイエンス

Genome Science of Model Organisms

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96P00105)

プロジェクトリーダー

小笠原直毅

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授

コアメンバー

田仲 可昌

筑波大学生物科学系・教授

中山 建男

宮崎医科大学医学部・教授

池内 昌彦

東京大学総合文化研究科・助教授



1. 研究目的

生命現象の統合的理解には、生命のプログラムであるゲノムの全構造の解明と、そこに存在する遺伝子のネットワークの解明とが必要である。本プロジェクトでは、我国で全ゲノム配列決定が推進された枯草菌とシアノバクテリアについて、配列決定により見出された新規遺伝子の機能解明をシステムチックに進め、ゲノムに書き込まれている生命活動のプログラムを解読するための基礎的研究を行った。また、高等生物のゲノム機能解析への橋渡しとして、細胞性粘菌の cDNA 解析も推進した。

- 1) 日本が配列決定を行った領域に見出された枯草菌新規遺伝子約 1,000 について、破壊変異株あるいは発現制御変異株を作成し、システムチックに機能と発現様式の解析を行う(小笠原 直毅)。
- 2) シアノバクテリアについて、系統的な破壊変異株作製を行い、光合成機能への影響を中心に、変異株の表現型について多面的なスクリーニングを進める(池内 昌彦)。
- 3) 個別遺伝子の解析と並行して、遺伝子発現の全体像とその動態を解析するために、プロテオーム解析技術を導入する(中山 建男)。
- 4) 細胞性粘菌の cDNA 配列決定を進め、多細胞生物に特有な遺伝子を洗い出し、新たな遺伝子機能を明らかにする(田仲 可昌)。



図1 ゲノムを蛍光標識した枯草菌

2. 研究成果概要

2.1 枯草菌のゲノム機能解析

枯草菌新規遺伝子の変異株作製は、我国で配列決定を分担した領域の約 1,000 遺伝子に加え、欧州の領域の約 460 遺伝子についても変異株作製も行った。その結果、枯草菌機能未知遺伝子のほとんどをカバーする 2,776 遺伝子についての変異株バンクが完成した。

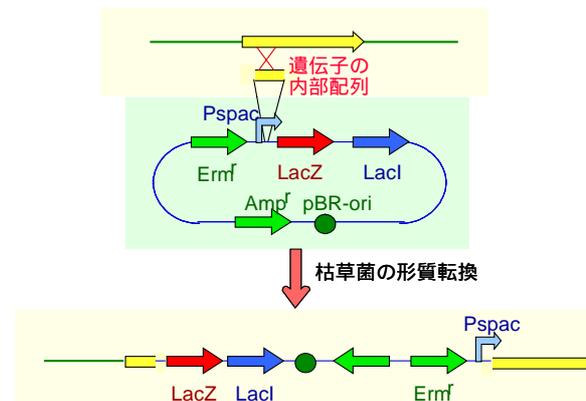


図2 枯草菌遺伝子破壊株の作製法

枯草菌変異株作製の過程で同定された細胞増殖に必須な新規必須遺伝子の情報と既知遺伝子の情報を総合することにより、枯草菌の富栄養培地・37度での増殖には、267 遺伝子が必須であることが明らかになった。この成果は一つの生物の必須遺伝子セットが始めて実験的に明らかになったという、非常に大きな意義を持っている。

一方、約 50 遺伝子について特異的機能を明らかにし、作製した変異株についてのシステムチックな表現型解析を約 800 遺伝子について行ったが、その徹底した表現型解析は今後の課題となった。

枯草菌変異株に組み込んだ LacZ レポーターと野生株を用いたノーザン解析により、各々約 800 遺伝子について発現情報を得た。しかしながら、研究の後半に DNA アレー技術が利用可能になったため、アレー技術の導入も進めた。

こうしたプロジェクトの成果は BSORFDB (<http://bacillus.genome.ad.jp>)上で世界に情報発信をしている。

2.2 プロテオーム解析

プロテオーム解析については、枯草菌蛋白質 2 次元電気泳動の標準プロトコルを確立し、N 末端アミノ酸配列分析により約 300 スポットを遺伝子と対応付けることができた。さらに、MALDI-TOF 型質量分析計を用いたマスマッピング法の導入や胞子外層の形成に関わる遺伝子ネットワークの解明への展開など、我国のプロテオーム研究を先導するような成果を得た。

2.3 シアノバクテリアのゲノム機能解析

シアノバクテリアについては、特定のモチーフをもつ遺伝子を中心に約 400 個の破壊株、また輸送体遺伝子の二重変異株、約 20 個の強制発現株を作製した。さらに、鉄の輸送体とその発現にかかわる遺伝子群、形質転換と twitching 運動、走光性にかかわる遺伝子群等を同定した。

また、DNA マイクロアレー解析を試み、環境ストレス(強光、低炭酸ガス条件など)における光合成生物の特徴的な遺伝子発現をモニターできることを実証するとともに、多数の新規遺伝子の発現調節を見いだした。

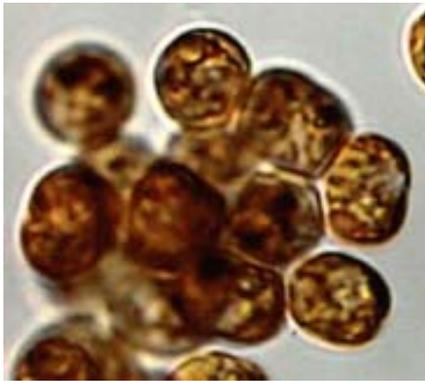


図3 シアノバクテリア

2.4 細胞性粘菌の cDNA 解析

細胞性粘菌については、18,000 クローンの移動体期 cDNA の配列決定を行い、得られた約 4,000 個の独立 EST について、機能分類表を作成し、約 1,700 クローンを分類することができた。さらに、増殖期の細胞の cDNA ライブラリーを作製し、80 種の高頻出の遺伝子 2,600 クローンを除き、約 8,500 クローンについて配列決定を終了し、総計して約 5,300 個の独立 EST を得た。

また、*in situ* ハイブリダイゼーションのシステムも完成し、空間的発現パターンの解析を開始した。細胞骨格質 50 種、Rab ファミリー蛋白質 20 種、cAMP のシグナル伝達系に関与する遺伝子 10 種、膜貫通型輸送蛋白質 30 個の解析を終了している。

こうした結果は <http://www.csm.biol.tsukuba.ac.jp/cDNAproject.html> で公開した。

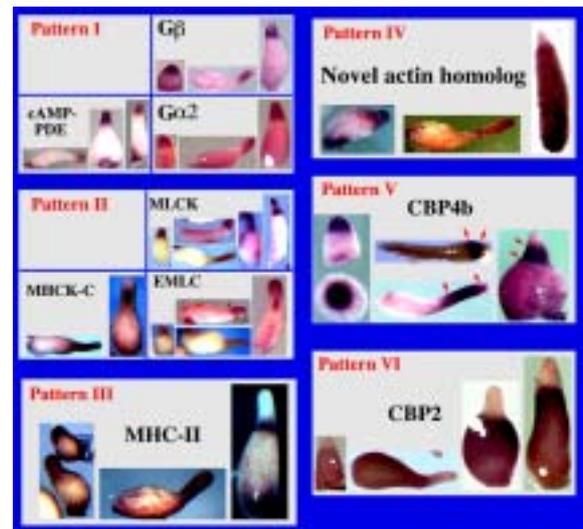


図4 細胞性粘菌 cDNA の空間的発現パターン

3. 結論

本研究で得られた、枯草菌・シアノバクテリアの変異株バンク、細胞性粘菌の cDNA クローンバンクは、新たな遺伝子機能研究のための大きな資産である。本研究を基礎として、枯草菌・シアノバクテリアの遺伝子・ゲノム機能の徹底した解明を進めることにより、微生物の諸細胞機能をシステムとして理解することが可能となる。また、本研究によって始まった細胞性粘菌のゲノム解析は、現在未知である出芽酵母と線虫の間を埋めるものであり、ゲノム進化の研究に新たな展開をもたらすと期待される。

4. 発表論文

- Ogasawara, N. (2000). Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res Microbiol* 151, 2, 129-134.
- Yoshida, K., Ishio, I., Nagakawa, E., Yamamoto, Y., Yamamoto, M., and Fujita, Y. (2000). Systematic study of gene expression and transcription organization in the *gntZ-ywaA* region of the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology* 146, Pt 3, 573-579.
- Yoshihara, S., Suzuki, F., Fujita, H., Geng, X.X. and Ikeuchi, M. (2000) Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 41, 1299-1304.
- Maeda, M., Kuwayama, H., Yokoyama, M., Nishio, K., Morio, T., Urushihara, H., Katoh, M., Tanaka, Y., Saito, T., Ochiai, H., Takemoto, K., Yasukawa, H. and Takeuchi, I. (2000). Developmental changes in the spatial expression of genes involved in myosin function in *Dictyostelium*. *Dev Biol* 223, 114-119.
- 他 原著論文 32 編、和文解説 8 編